

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

AM

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 3 月 29 日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/21788 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 5/10, C07K 14/52, 16/24, G01N 33/53, 33/577, C12P 21/08
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 後飯塚僚 (GOITSUKA, Ryo) [JP/JP]; 〒113-0022 東京都文京区千駄木 2-48-4-705 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06351
- (22) 国際出願日: 2000 年 9 月 18 日 (18.09.2000)
- (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町 37-10 麻仁ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) 優先権データ:  
特願平 11/263778 1999 年 9 月 17 日 (17.09.1999) JP
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MAST CELL-SPECIFIC SIGNAL TRANSDUCING MOLECULES AND cDNAs THEREOF

(54) 発明の名称: マスト細胞特異的シグナル伝達分子とその cDNA

(57) Abstract: A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 which is a signal transducing molecule expressed specifically in mouse mast cells; a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4 which is a signal transducing molecule expressed specifically in human mast cells; polynucleotides encoding these proteins; expression vectors carrying these polynucleotides; cells transformed by these expression vectors; and antibodies against the above proteins. These signal transducing molecules are useful in, for example, screening novel drugs against allergic diseases.

(57) 要約:

この出願は、マウス・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質と、ヒト・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するタンパク質、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを保有する発現ベクター、これらの発現ベクターによる形質転換細胞、ならびに前記タンパク質に対する抗体を提供する。この発明によって提供されるシグナル伝達分子は、アレルギー疾患に対する新規薬剤のスクリーニング等に有用である。

WO 01/21788 A1

## 明細書

## マスト細胞特異的シグナル伝達分子とその cDNA

## 5 技術分野

この出願の発明は、マウスおよびヒトの各々のマスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子と、このタンパク質分子をコードするポリヌクレオチド (cDNA) に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、例えばアレルギー疾患の治療薬剤をスクリーニングする際の標的分子等として有用な新規タンパク質と、このタンパク質を生産やその機能解析等に有用な各種遺伝子工学材料に関するものである。

## 背景技術

I 型アレルギー反応は、主にマスト細胞および好塩基球で発現される高親和性の IgE レセプターが、IgE 抗体とアレルゲンにより架橋されることを介して、ヒスタミンやセロトニン等を含む顆粒を放出することによって引き起こされる複雑な免疫反応である。そしてこの反応は以下の 3 つの過程から構成されることが明らかにされている。

A) アレルゲンの刺激による T 細胞からの IL-4 や IL-5 等のサイトカインの産生と、それによって誘導される B 細胞による IgE 抗体の産生やマスト細胞の分化・増殖等の初期過程。

B) IgE 抗体およびアレルゲンによる Fcε レセプターの架橋からマスト細胞の脱顆粒にいたる中期過程。

C) 脱顆粒後のヒスタミンやセロトニン等による血管透過性亢進等の後期課程。

25

一方、この出願の発明者らは、B 細胞系列に特異的に発現するアダプター分子、BASH を単離している (J. Immunol. 161:5804-5808, 1998)。この BASH は、T 細胞で発現する SLP-76 (J. Biol. Chem. 270:7029-7032, 1995) と分子構造的に類似して

おり、その構造および機能解析を通して、血球系列・免疫レセプターに特異的なシグナル伝達分子ファミリーが存在することを示している。

現在のところ、アレルギーの治療法としては、減感作療法などの B 細胞による IgE  
5 抗体産生（初期過程）の抑制、あるいは抗ヒスタミン剤等の投与による後期課程の抑制が行われているが、いずれも効果的な治療法とはなっていないのが現状である。

一方、前記のとおり、I 型アレルギー反応の分子機構について一部が明らかになりつつある。しかしながら、高親和性 IgE レセプターを介したマスト細胞の脱顆粒  
10 に関するシグナル伝達の機構については知られていない。このマスト細胞の脱顆粒プロセスに関する分子を明らかにすることは、アレルギー反応の分子機構を解明するためばかりでなく、アレルギー疾患の治療方法あるいは治療薬剤を開発するためにも不可欠である。特に、マスト細胞はアレルギー症状発現の根幹であること  
15 から、このマスト細胞に特異的に発現するシグナル伝達分子は、ヒスタミンやセロトニン等の脱顆粒反応に至る FcεR レセプターシグナル伝達系を選択的に遮断する新しい抗アレルギー剤の開発にとって極めて重要である。

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、マウス  
およびヒトの各々のマスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子と、このタン  
20 パク質分子をコードするポリヌクレオチド（cDNA）を提供することを課題としている。

またこの出願の発明は、前記のシグナル伝達分子に関する各種の遺伝子工学材料を提供することを課題としている。

## 25 発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(10)の発明を提供する。

(1) マウス・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号

2のアミノ酸配列からなる精製タンパク質。

(2) ヒト・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号4のアミノ酸配列を有する精製タンパク質。

(3) 配列番号1の塩基配列からなり、発明(1)のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(4) 配列番号3の塩基配列を有し、発明(2)のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(5) 発明(3)のポリヌクレオチドを保有する発現ベクター。

(6) 発明(4)のポリヌクレオチドを保有する発現ベクター。

(7) 発明(5)の発現ベクターによる形質転換体であって、発明(1)のタンパク質を生産しうる形質転換細胞。

(8) 発明(6)の発現ベクターによる形質転換体であって、発明(2)のタンパク質を生産しうる形質転換細胞。

(9) 発明(1)のタンパク質に対する抗体。

(10) 発明(2)のタンパク質に対する抗体。

#### 図面の簡単な説明

図1は、血球系細胞および非血球系細胞における MIST、BASH および SLP-76 の発現を調べたノーザンブロット分析の結果である。18-18 は B 前駆細胞、WEHI1279 は B 細胞、L1210 は B リンパ球前駆細胞、J558L および P3U1 は形質細胞、EL-4 および BW 5147 は T 細胞、P388D1 および WEHI3 はマクロファージ、P815 はマスト細胞、B8/3 は赤芽球細胞、そして B16、Y1、NIH3T3 および ES-E14 は非血球系細胞である。

図2は、マウスおよびヒト MIST の発現を様々な血球系細胞で調べた RT-PCR 分析の結果である。

図3および図4は、Nc/Nga マウスのアトピー性皮膚炎における炎症マスト細胞での MIST 発現を調べた免疫組織分析の結果である。

図5は、野生型 MIST または変異型 MIST を発現する RBL-2H3 クローンの脱顆粒

反応の結果である。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明者は、EST データベースのスクリーニングによって、13.5 日齢の  
5 マウス胎児 cDNA の EST クローン (GenBank accession No. AA166259) が、ニワ  
トリ BASH (J. Immunol. 161:5804-5808, 1998) の SH2 ドメインと高い相同性を有  
することを見出し、さらにこのクローンの 1.8 kb mRNA が、BASH や SLP-76 を発  
現する他の血球系列細胞や非血球系列細胞 (B 細胞、T 細胞、マクロファージ等) で  
は発現せず、マスト細胞株 P815 でのみ発現することを見出した (図 1)。そして、  
10 このような特異的発現パターンと、後記するその機能から、このタンパク質分子を  
MIST (Mast Cell-specific Immunoreceptor Signal Transducer) と命名し、この出願  
の発明を完成させた。

以下、この出願の各発明について、実施形態を詳しく説明する。

15 この出願の発明(1)および(2)の MIST は、各々、マウスおよびヒトのマスト細胞で  
特異的に発現するタンパク質である。発明(1)のマウス MIST は発明(3)のポリヌクレ  
オチド (完全長 cDNA : 配列番号 1) にコードされているタンパク質である。一方、  
発明(2)のヒト MIST は、配列番号 3 (部分 cDNA) を含む発明(4)のポリヌクレオチ  
ドにコードされているタンパク質である。

20 発明(1)のマウス MIST および発明(2)のヒト MIST は、各々マウスおよびヒトの臓  
器、細胞株などから単離する方法、この出願によって提供されるアミノ酸配列に基  
づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいは前記発明(3)および(4)のポ  
リヌクレオチドを用いて組換え DNA 技術で生産する方法などにより取得することが  
25 できるが、組換え DNA 技術で取得する方法が好ましく用いられる。例えば、前記発  
明(3)および(4)のポリヌクレオチドを有するベクターからインビトロ転写によって  
RNA を調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで  
MIST を発現できる。また翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換え

ることにより、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞で、ポリヌクレオチドがコードしているマウス MIST およびヒト MIST を大量に発現させることができる。

5 前記発明(3)のポリヌクレオチド(配列番号1)は、化学合成による方法やマウス cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法などを用いて取得することができる。cDNA ライブラリーから目的のポリヌクレオチドをクローン化するには、この出願によって提供される配列番号1の任意部分の塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いて、公知の方法によりコロニーあるいはブ  
10 ラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行えばよい。また、目的とするポリヌクレオチドの両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いて、マウス細胞から単離したゲノム DNA を鋳型とする PCR 法により、前記発明(3)のポリヌクレオチドを調製することもできる。

一方、発明(4)のポリヌクレオチドは、この出願によって提供される配列番号3の  
15 任意部分の塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション・スクリーニングや PCR により完全長 cDNA を単離することによって調製することができる。

MIST をインビトロ翻訳でポリヌクレオチドを発現させて生産させる場合には、例  
20 えば前記発明(3)または(4)のポリヌクレオチドを、RNA ポリメラーゼプロモーターを有するベクターに組換え[発明(5)(6)]、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、マウスおよびヒトの MIST をそれぞれインビトロで生産することができる。RNA  
ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの  
25 RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。

MIST を大腸菌などの微生物でポリヌクレオチドを発現させて生産させる場合に



は、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、前記発明(3)または(4)のポリヌクレオチドを翻訳領域を組み換えた発現ベクター〔発明(5)(6)〕を作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体〔発明  
5 (7)(8)〕を培養すれば、これらのポリヌクレオチドがコードしている MIST を微生物内で大量生産することができる。この際、任意の翻訳領域の前後に開始コドンと停止コドンが付加して発現させれば、任意の領域を含む MIST 断片を得ることができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。この融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによってこの cDNA がコードする蛋  
10 白質部分のみを取得することもできる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。

MIST を真核細胞でポリヌクレオチドを発現させて生産させる場合には、前記発明(3)または(4)のポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付  
15 加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに組換え〔発明(5)(6)〕、真核細胞内に導入すれば〔発明(7)(8)〕、MIST を真核細胞内で生産することができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2 などが例示できる。また、pIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1 などを発現ベクターとして用いれば、His タグ、FLAG タ  
20 グ、GFP など各種タグを付加した融合タンパク質として発現させることもできる。真核細胞としては、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、MIST を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシ  
25 ウム法、リボソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いることができる。

MIST を原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から目的タンパク質を単離

精製するためには、公知の分離操作を組み合わせることができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどがあげられる。

発明(1)のマウス MIST および発明(2)のヒト MIST には、それぞれ配列番号2および4のアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列からなるペプチド断片（5アミノ酸残基以上）も含まれる。これらのペプチド断片は抗体を作製するための抗原として用いることができる。また、発明(1)および(2)の MIST は、翻訳された後、細胞内で各種修飾を受ける。したがって、これらの修飾されたタンパク質もこの出願の発明の範囲に含まれる。このような翻訳後修飾としては、N末端メチオニンの脱離、N末端アセチル化、糖鎖付加、細胞内プロテアーゼによる限定分解、ミリスチル化、イソプレニル化、リン酸化などが例示できる。

また、一般に動物遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号1および3の塩基配列において、1または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および/または他のヌクレオチドによる置換がなされているポリヌクレオチドもこの発明の範囲に含まれる。

同様に、これらの変更によって生じる1または複数個のアミノ酸の付加、欠失および/または他のアミノ酸による置換がなされている MIST も、配列番号2および4のアミノ酸配列を有する MIST を有する限り、この発明の範囲に含まれる。

さらに、発明(3)および(4)のポリヌクレオチドには、各々、配列番号1および3のいかなる部分塩基配列からなる DNA 断片（10bp 以上）も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなる DNA 断片もこの範囲に含まれる。

発明(9)および(10)の抗体は、前記発明(1)および(2)のタンパク質をそれぞれ抗原と

して用いて動物を免疫した後、血清から得ることが出来る。抗原としては配列番号 2 または 4 のアミノ酸配列に基づいて化学合成したペプチドや、真核細胞や原核細胞で発現させた MIST それ自体を用いることができる。あるいは、上記の真核細胞用発現ベクターを注射や遺伝子銃によって、動物の筋肉や皮膚に導入した後、血清を採取することによって作製することができる（例えば、特開平 7-313187 号公報記載の方法）。動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリなどが用いられる。免疫した動物の脾臓から採取した B 細胞をミエローマと融合させてハイブリドーマを作製すれば、MIST に対するモノクローナル抗体を産生することができる。

#### 10 実施例

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

##### 実施例 1 : cDNA クローニング

15 マウス MIST の完全長 cDNA を、EST クローン (GenBank accession No. AA166259) の配列情報に基づいて作成したプライマーを用い、5'-および 3'-RACE (Marathon cDNA amplification kit, Clontech 社製) により PJ18 cDNA ライブラリーから単離した。また、ヒト MIST の部分 cDNA は、文献 (Blood 86:3705-3714, 1995) 記載の方法に従い、IL-6 および幹細胞因子 (SFC: Peprötech 社製) と共に培養したヒト臍帯血由来マスト細胞 (HCMC) から調製した mRNA を鋳型として PCR

20 によって増幅した。

得られた cDNA の配列を公知の方法により決定し、マウス MIST の cDNA は配列番号 1 の塩基配列からなり、またヒト MIST の部分 cDNA は配列番号 3 の塩基配列からなることが確認された。また、マウス MIST は配列番号 2 のアミノ酸配列を有し、

25 分子量は約 60kDa であることが確認された。このマウス MIST には N 末端から中央にかけて、リン酸化される可能性のある Tyr 残基が 8 個認められる。また C 末端には、BASH や SLP-76 とアミノ酸レベルでそれぞれ 41%、53% の相同性を示す SH2 ドメインが存在する。さらに MIST 分子中央部には Pro 残基にとむ領域があり、SH3 ド

メイン結合モチーフが認められることから、MIST は典型的なシグナル分子としての特徴を有していることが確認された。

一方、ヒト MIST は、マウス MIST とアミノ酸レベルで約 60% のホモロジーを示した。

5

#### 実施例 2 : 発現ベクターの構築

実施例 1 で得たマウス MIST の cDNA 翻訳領域を PCR 増幅し、発現ベクター pCATneo (J. Immunol. 161:5804-5808, 1998) の EcoRI-Sal I サイトに挿入し、組換え発現ベクター (pCATneo-MIST-WT) を構築した。

10. また、市販のミュートーションキット (Stratagene 社製) を用いた PCR 変異導入法により、配列番号 2 の 69、96、101、153、174 および 188 位置の Tyr を Phe に置換した変異 MIST (MIST-YF) を調製し、これを発現ベクター pCATneo にサブクローニングして組換え発現ベクター (pCATneo-MIST-YF) を構築した。

#### 15 実施例 3 : 形質転換細胞の作成

ラットのマスト細胞様細胞株 RBL-2H3 に、実施例 2 で作成した組換え発現ベクター pCATneo-MIST および pCATneo-MIST-YF をそれぞれエレクトロポレーション法によりトランスフェクトし、形質転換細胞 RBL-2H3-MIST および RBL-2H3-MIST-YE を作成した。

20

#### 実施例 4 : 抗体の作成

配列番号 2 の 193-435 アミノ酸配列からなるポリペプチドとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質によって免疫したウサギから抗 MIST 抗体を作成した。まず、抗血清を GST 結合セファロースビーズで前処理し、

25

次いで、GST-MIST 融合タンパク質を充填したアフィニティカラムで精製した。アフィニティ精製抗体の特異性は、マウス MIST の cDNA をトランスフェクトした COS 細胞の溶出物に対する免疫ブロット分析により確認した。

#### 実施例 5 : 各種細胞株における MIST 発現の確認

実施例 1 で得たマウスおよびヒト MIST の発現を RT-PCR により確認した。対象とした細胞は、IL-3 で誘導したマウス骨髄由来のマスト細胞 (BMMC)、マウス・マスト細胞株 PT18、SCF と IL-6 と共に培養したヒトマスト細胞 (HCNC)、および他の血球系列細胞 (Jurkat : ヒト T 細胞、Romas : ヒト B 細胞、KU812 : ヒト好塩基球前駆細胞、EOL-1 : 好酸球前駆細胞) である。

結果は図 2 に示したとおりであり、MIST の発現はマスト細胞 BMMC、PT18 および HCNC において見出されたが、他の細胞株では発現していなかった。

また、アトピー性皮膚炎様の症状を自然発症する Nc/Nga マウス (J. Immunol. 9:461-466, 1997) の皮膚切片を、実施例 4 の抗 MIST 抗体で染色し、MIST が in vivo 正常マスト細胞で発現しているか否かを検討した。結果は図 3 および図 4 に示したとおりであり、マウスの炎症マスト細胞において MIST 発現が認められた。

以上の結果から、MIST はマスト細胞で特異的に発現するタンパク質であることが確認された。

15

#### 実施例 6 : MIST におけるチロシン・リン酸化の確認

Fc $\epsilon$ RI のシグナル伝達を確認されているラット・マスト細胞株 RBL-2H3 を用い、Fc $\epsilon$ RI 刺激によって MIST のチロシンがリン酸化されるか否かを検討した。

実施例 3 で作成した形質転換細胞 RBL-2H3-MIST を、10  $\mu$ g の抗 DNP マウス IgE (シグマ社製) で 1 時間インキュベートし、次いで 100 ng/ml の DNP-HAS で刺激した。細胞を 1% NP 40 溶解バッファーで溶解し、各種の抗体と共に免疫沈降した。

その結果、MIST 分子は、マスト細胞上の Fc $\epsilon$ レセプターを IgE および抗原で刺激することにより、チロシンリン酸化され、PLC-g ならびに Vav 等のシグナル分子と会合することから、Fc $\epsilon$ レセプターの下流に存在するシグナル分子であることが確認された。また、MIST は、マスト細胞に存在するチロシンキナーゼの中で、Lyn キナーゼによって強くリン酸化されたが、この Lyn キナーゼはマスト細胞の脱顆粒において重要な役割を持つことが確認されている。

25

### 実施例 7 : マスト細胞の脱顆粒における MIST 作用の検討

実施例 3 で作成した形質転換細胞 RBL-2H3-MIST および RBL-2H3-MIST-YF を用い、MIST および変異型 MIST の過剰発現が細胞の脱顆粒に影響を及ぼすか否かを検討した。

- 5 細胞を  $1 \mu\text{g/ml}$  の抗 DNP マウス IgE で一晩インキュベートし、PBS で 2 回洗浄した後、DNP-HAS で  $37^{\circ}\text{C}$ 、30 分間刺激した。脱顆粒は、文献 (Int. Immunol. 7:251-258, 1992) 記載の方法により  $\beta$ -hexosaminidase の放出を測定することにより確認した。

- 10 結果は図 5 に示したとおりである。野生型の MIST を過剰発現させた場合には、 $\text{Fc}\epsilon$  レセプター刺激によるマスト細胞の脱顆粒は影響を受けなかったが、変異型 MIST (MIST-YF) の過剰発現は  $\text{Fc}\epsilon$  レセプターを介したマスト細胞の脱顆粒が有意に抑制された。

以上の結果から、MIST 分子は  $\text{Fc}\epsilon$  レセプター刺激から脱顆粒に至るシグナル伝達系において重要な役割を果たす分子であることが確認された。

15

### 産業上の利用可能性

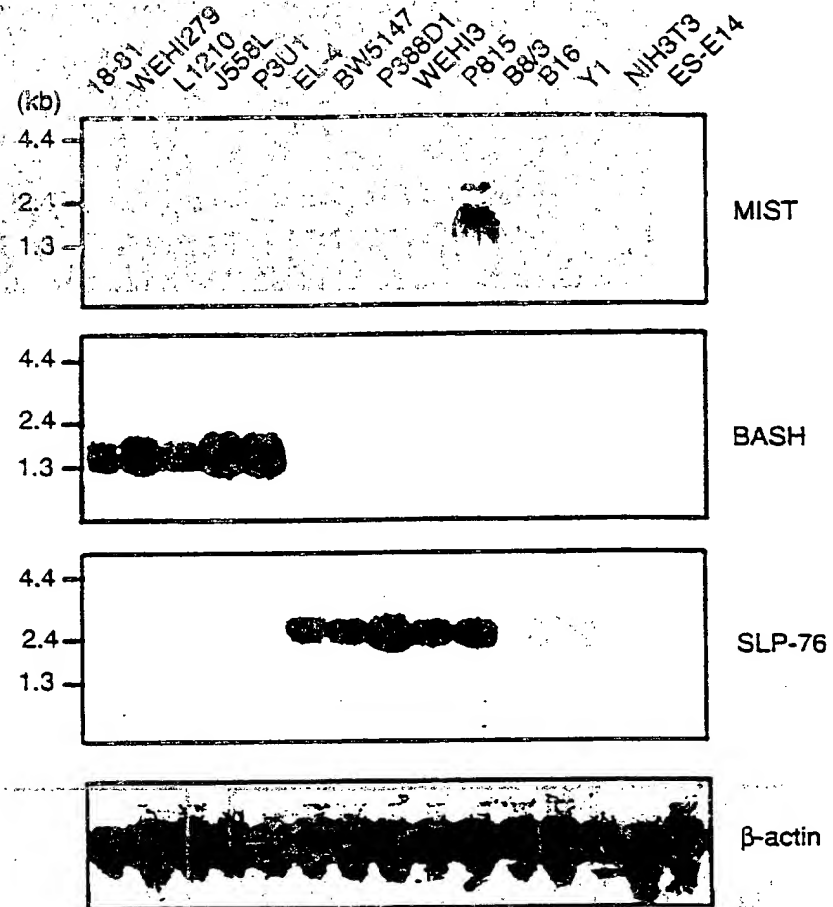
- この出願の発明によって、マウスおよびヒトの各々のマスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子と、このタンパク質分子をコードするポリヌクレオチド (cDNA)、並びにこれらのシグナル伝達分子に関する各種の遺伝子工学材料が提供  
20 される。これらのシグナル伝達分子を標的とすることによって、アレルギー疾患に対する新規薬剤のスクリーニング等が可能となる。

## 請求の範囲

1. マウス・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる精製タンパク質。
- 5 2. ヒト・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する精製タンパク質。
3. 配列番号 1 の塩基配列からなり、請求項 1 のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- 10 4. 配列番号 3 の塩基配列を有し、請求項 2 のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- 15 5. 請求項 3 のポリヌクレオチドを保有する発現ベクター。
6. 請求項 4 のポリヌクレオチドを保有する発現ベクター。
7. 請求項 5 の発現ベクターによる形質転換体であって、請求項 1 のタンパク質  
20 を生産しうる形質転換細胞。
8. 請求項 6 の発現ベクターによる形質転換体であって、請求項 2 のタンパク質を生産しうる形質転換細胞。
- 25 9. 請求項 1 のタンパク質に対する抗体。
10. 請求項 2 のタンパク質に対する抗体。

1/3

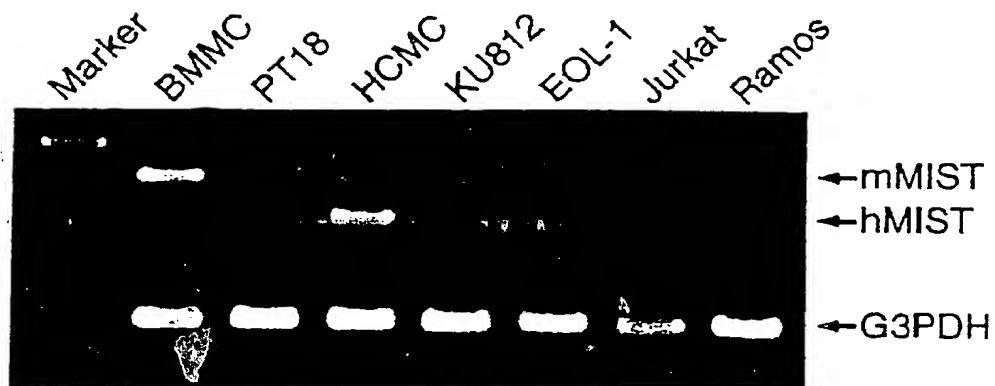
1





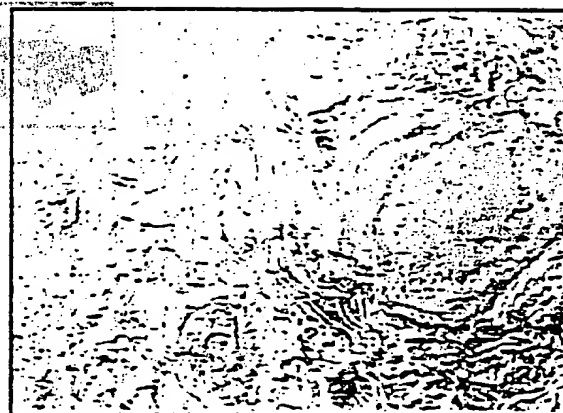
2/3

2



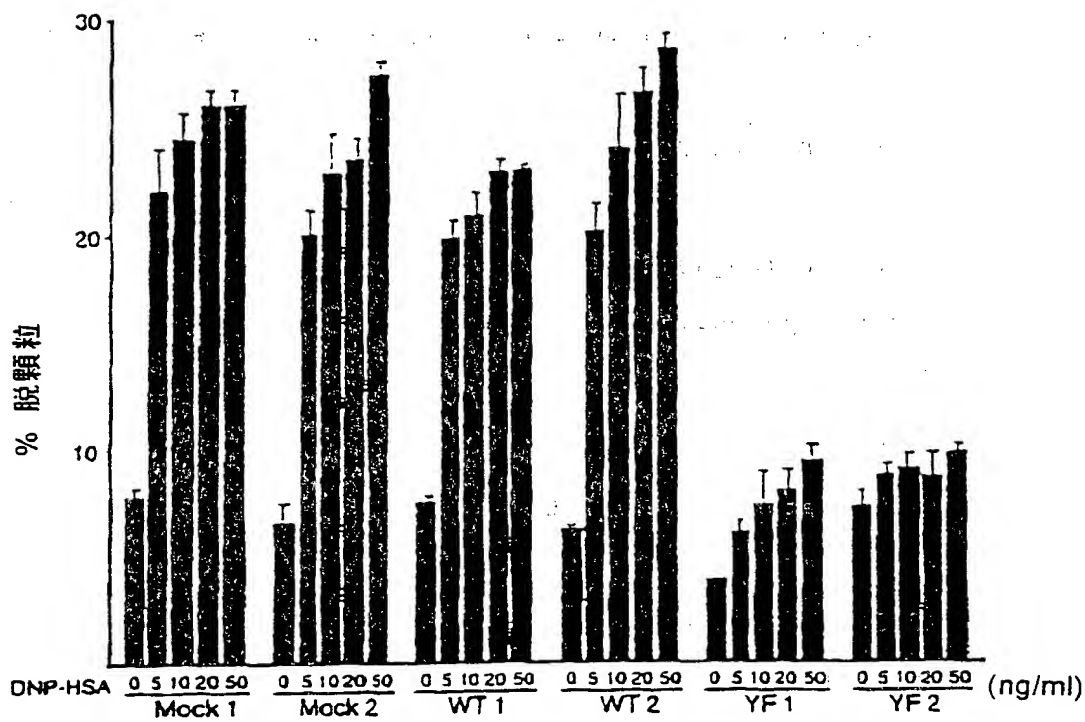
3

4



3/3

図 5



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> A mast cell-specific adapter molecules and cDNAs thereof

5

<130> 00-F-047PCT/YS

<150> JP11-263778

<151> 1999-09-17

10

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

15

<211> 1721

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

20

<222> (255)..(1562)

<300>

<301> Goitsuka R., et al.

<302> A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clink involved in IgE  
receptor-mediated mast cell degranuation

25

<303> Int. Immunol.

<304> 12

<305> 4

<306> 573-580

<307> 2000

<308> AB021220

<309> 2000-05-26

5 <400> 1

acgaggccaa actgccagg tctgtggctg cgtttctcgg aaaacaaaa ctcaacaggc 60

acatacaagg cactctctgc tgaaggactc tgctgagggg agagaacatg tcaactctat 120

cttacagagt gctccaggat gcgaccgtgg accccctttc caggagctag ccgtctcaac 180

actgagccct tgactaaagg aagactgagc aggctgagtt gaagatccct ctcttttgcc 240

10 aggtgccaaag gacc atg acc agc cag ggc aat aaa agg aca acg aaa gaa 290

Met Thr Ser Gln Gly Asn Lys Arg Thr Thr Lys Glu

1 5 10

gga ttc ggt gat ctg aga ttc cag aac gtc tct ctg ctg aaa aat agg 338

Gly Phe Gly Asp Leu Arg Phe Gln Asn Val Ser Leu Leu Lys Asn Arg

15 15 20 25

tca tgg cca agc ctc agc agt gcc aaa ggg cgg tgt cga gcg gtt ctg 386

Ser Trp Pro Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gly Arg Cys Arg Ala Val Leu

30 35 40

gaa cca ctt ccg gat cac aga agg aac ttg gct ggg gtc cca ggt gga 434

20 Glu Pro Leu Pro Asp His Arg Arg Asn Leu Ala Gly Val Pro Gly Gly

45 50 55 60

gaa aaa tgcaaac agt aac aac gac tac gaa gat cct gag ttc cag ctg 482

Glu Lys Cys Asn Ser Asn Asn Asp Tyr Glu Asp Pro Glu Phe Gln Leu

65 70 75

25 ctg aag gca tgg cca tca atg aaa att tta cca gcc aga cct atc cag 530

Leu Lys Ala Trp Pro Ser Met Lys Ile Leu Pro Ala Arg Pro Ile Gln

80 85 90

gaa tcg gaa tac gca gat aca cgc tat ttc cag gat atg atg gag gct 578

Glu Ser Glu Tyr Ala Asp Thr Arg Tyr Phe Gln Asp Met M t Glu Ala  
 95 100 105  
 ccc ctt ctg tta cct ccc aag gct tct gtc tcc act gag aga caa acc 626  
 Pro Leu Leu Leu Pro Pro Lys Ala Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Thr  
 5 110 115 120  
 agg gat gtg agg atg aca cag ctg gaa gaa gtg gac aag cct acc ttc 674  
 Arg Asp Val Arg Met Thr Gln Leu Glu Glu Val Asp Lys Pro Thr Phe  
 125 130 135 140  
 aag gat gtc aga agc caa cgc ttt aaa gga ttc aaa tac aca aaa ata 722  
 10 Lys Asp Val Arg Ser Gln Arg Phe Lys Gly Phe Lys Tyr Thr Lys Ile  
 145 150 155  
 aac aag act cct ttg cca cct cct cgg cct gct atc act ctc ccc aag 770  
 Asn Lys Thr Pro Leu Pro Pro Pro Arg Pro Ala Ile Thr Leu Pro Lys  
 160 165 170  
 15 aag tac caa ccc tta ccc cca gca cca cca gag gag agc agt gca tac 818  
 Lys Tyr Gln Pro Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Glu Ser Ser Ala Tyr  
 175 180 185  
 ttc gct cca aag ccc acc ttt cca gaa gtc cag agg ggg ccc agg cag 866  
 Phe Ala Pro Lys Pro Thr Phe Pro Glu Val Gln Arg Gly Pro Arg Gln  
 20 190 195 200  
 agg agt gca aaa gac ttc agt agg gtc ctt gga gca gaa gaa gaa tct 914  
 Arg Ser Ala Lys Asp Phe Ser Arg Val Leu Gly Ala Glu Glu Glu Ser  
 205 210 215 220  
 cac cac cag aca aag cca gaa tct tct tgc cca tca tca aac caa aac 962  
 25 His His Gln Thr Lys Pro Glu Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asn Gln Asn  
 225 230 235  
 aca cag aag agt cca cct gcc att gcc agc tct tcc tac atg cca gga 1010  
 Thr Gln Lys Ser Pro Pro Ala Ile Ala Ser Ser Ser Tyr Met Pro Gly

240 245 250  
 aag cac agt ata caa gcc aga gac cat aca ggt agc atg cag cac tgt 1058  
 Lys His Ser Ile Gln Ala Arg Asp His Thr Gly Ser Met Gln His Cys  
 255 260 265  
 5 cct gct cag aga tgc caa gct gca gcc agc cac agc cct cga atg ctg 1106  
 Pro Ala Gln Arg Cys Gln Ala Ala Ala Ser His Ser Pro Arg Met Leu  
 270 275 280  
 ccc tat gaa aac aca aac tcg gag aaa cct gac ccc aca aag cct gat 1154  
 Pro Tyr Glu Asn Thr Asn Ser Glu Lys Pro Asp Pro Thr Lys Pro Asp  
 10 285 290 295 300  
 gag aag gat gtc tgg cag aat gaa tgg tac att gga gaa tac agt cgc 1202  
 Glu Lys Asp Val Trp Gln Asn Glu Trp Tyr Ile Gly Glu Tyr Ser Arg  
 305 310 315  
 cag gca gtg gaa gat gtg tta atg aaa gag aac aag gat ggt act ttt 1250  
 15 Gln Ala Val Glu Asp Val Leu Met Lys Glu Asn Lys Asp Gly Thr Phe  
 320 325 330  
 ttg gtc cga gac tgc tct aca aaa tcc aag gca gaa cca tat gtt ttg 1298  
 Leu Val Arg Asp Cys Ser Thr Lys Ser Lys Ala Glu Pro Tyr Val Leu  
 335 340 345  
 20 gtg gtg ttt tat ggg aac aag gtc tac aat gtg aaa atc cgt ttc ctc 1346  
 Val Val Phe Tyr Gly Asn Lys Val Tyr Asn Val Lys Ile Arg Phe Leu  
 350 355 360  
 gag agc aat caa cag ttt gcc ctg ggc aca gga cta cga gga aat gag 1394  
 Glu Ser Asn Gln Gln Phe Ala Leu Gly Thr Gly Leu Arg Gly Asn Glu  
 25 365 370 375 380  
 atg ttt gat tct gtg gaa gac atc att gaa cac tac aca tat ttt ccc 1442  
 Met Phe Asp Ser Val Glu Asp Ile Ile Glu His Tyr Thr Tyr Phe Pro  
 385 390 395

att ctg cta ata gat ggg aaa gac aag gct gca cgc agg aaa cag tgc 1490  
 Ile Leu Leu Ile Asp Gly Lys Asp Lys Ala Ala Arg Arg Lys Gln Cys  
 400 405 410  
 tac ctc acc cag cca ctg cct ctc gcc agg ctc ctt ctc act cag tac 1538  
 5 Tyr Leu Thr Gln Pro Leu Pro Leu Ala Arg Leu Leu Leu Thr Gln Tyr  
 415 420 425  
 tcc agc cag gca ctt cat gag taa gaagcccagc cagatatccc cgcacagtg 1592  
 Ser Ser Gln Ala Leu His Glu  
 430 435  
 10 gcctgggcct tgtctcattc ctggctcaat ggattcagtt cttcttccat ctgcatttat 1652  
 ctgcaaagta ttattttctg tgtcttcaag ggatgatttt ttgactctgt aaaaaaaaaa 1712  
 aaaaaaaaaa 1721  
 15 <210> 2  
 <211> 435  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 2  
 20 Met Thr Ser Gln Gly Asn Lys Arg Thr Thr Lys Glu Gly Phe Gly Asp  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Phe Gln Asn Val Ser Leu Leu Lys Asn Arg Ser Trp Pro Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Ser Ala Lys Gly Arg Cys Arg Ala Val Leu Glu Pro Leu Pro  
 25 35 40 45  
 Asp His Arg Arg Asn Leu Ala Gly Val Pro Gly Gly Glu Lys Cys Asn  
 50 55 60  
 Ser Asn Asn Asp Tyr Glu Asp Pro Glu Phe Gln Leu L u Lys Ala Trp

BNSDOCID: <WO\_\_0121788A1\_I\_>



290 295 300  
Trp Gln Asn Glu Trp Tyr Ile Gly Glu Tyr Ser Arg Gln Ala Val Glu  
305 310 315 320  
Asp Val Leu Met Lys Glu Asn Lys Asp Gly Thr Phe Leu Val Arg Asp  
5 325 330 335  
Cys Ser Thr Lys Ser Lys Ala Glu Pro Tyr Val Leu Val Val Phe Tyr  
340 345 350  
Gly Asn Lys Val Tyr Asn Val Lys Ile Arg Phe Leu Glu Ser Asn Gln  
355 360 365  
10 Gln Phe Ala Leu Gly Thr Gly Leu Arg Gly Asn Glu Met Phe Asp Ser  
370 375 380  
Val Glu Asp Ile Ile Glu His Tyr Thr Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Ile  
385 390 395 400  
Asp Gly Lys Asp Lys Ala Ala Arg Arg Lys Gln Cys Tyr Leu Thr Gln  
15 405 410 415  
Pro Leu Pro Leu Ala Arg Leu Leu Leu Thr Gln Tyr Ser Ser Gln Ala  
420 425 430  
Leu His Glu  
435

20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1129

&lt;212&gt; DNA

25

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1128)

- <300> *Goitsuka R. et al. J Biol Chem 271:10111-10115 (1996)*
- <301> Goitsuka R. et al. J Biol Chem 271:10111-10115 (1996)
- <302> A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clink involved in IgE receptor-mediated mast cell degranuation
- 5 <303> Int. Immunol. 12:1011-1015 (2000)
- <304> 12
- <305> 4
- <306> 573-580
- <307> 2000
- 10 <308> AB021220
- <309> 2000-05-26
- <400> 3
- ttc cag aac ttc agt ctg cca aaa aac agg tca tgg cct cgc atc aat 48
- 15 Phe Gln Asn Phe Ser Leu Pro Lys Asn Arg Ser Trp Pro Arg Ile Asn
- 1-5 10 15
- agt gcc aca ggc cag tac cag agg atg aac aag cct ctt cta gac tgg 96
- Ser Ala Thr Gly Gln Tyr Gln Arg Met Asn Lys Pro Leu Leu Asp Trp
- 20 25 30
- 20 gaa aga aac ttt gct gca gtc ctg gat gga gca aaa ggc cac agt gat 144
- Glu Arg Asn Phe Ala Ala Val Leu Asp Gly Ala Lys Gly His Ser Asp
- 35 40 45
- gat gac tat gat gac cct gag ctt cgg atg gaa gag aca tgg cag tgg 192
- Asp Asp Tyr Asp Asp Pro Glu Leu Arg Met Glu Glu Thr Trp Gln Ser
- 25 50 55 60
- att aaa att tta cca gcc cgg cct ata aag gaa tct gaa tat gca gat 240
- Ile Lys Ile Leu Pro Ala Arg Pro Ile Lys Glu Ser Glu Tyr Ala Asp
- 65 70 75 80

aca cac tat ttc aag gtt gca atg gac act ccc ctt ccg tta gac acc 288  
 Thr His Tyr Phe Lys Val Ala Met Asp Thr Pro Leu Pro Leu Asp Thr  
 85 90 95  
 agg acc tct atc tcc att gga cag ccg acc tgg aac aca cag acg agg 336  
 5 Arg Thr Ser Ile Ser Ile Gly Gln Pro Thr Trp Asn Thr Gln Thr Arg  
 100 105 110  
 ttg gaa aga gtg gac aaa ccc att tcc agg gac gtc aga agc caa aac 384  
 Leu Glu Arg Val Asp Lys Pro Ile Ser Arg Asp Val Arg Ser Gln Asn  
 115 120 125  
 10 att aaa gga gat gca tcc gta aga aag aac aag att cct tta cca cct 432  
 Ile Lys Gly Asp Ala Ser Val Arg Lys Asn Lys Ile Pro Leu Pro Pro  
 130 135 140  
 cct cgg cct ctc ata aca ctt ccg aag aag tac caa ccc ttg ccc cct 480  
 Pro Arg Pro Leu Ile Thr Leu Pro Lys Lys Tyr Gln Pro Leu Pro Pro  
 15 145 150 155 160  
 gag ccg gag agc agc agg cca cct tta tct cag aga cac acc ttt cca 528  
 Glu Pro Glu Ser Ser Arg Pro Pro Leu Ser Gln Arg His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
 gaa gtc cag gga atg ccc agt cag ata agc tta agg gac tta agt gag 576  
 20 Glu Val Gln Gly Met Pro Ser Gln Ile Ser Leu Arg Asp Leu Ser Glu  
 180 185 190  
 gtc ctt gaa gca gaa aaa gtt cct cat aac cag agg aag cct gaa tca 624  
 Val Leu Glu Ala Glu Lys Val Pro His Asn Gln Arg Lys Pro Glu Ser  
 195 200 205  
 25 act cat ctg tta gaa aac caa aat act caa gag att cca ctt gcc att 672  
 Thr His Leu Leu Glu Asn Gln Asn Thr Gln Glu Ile Pro Leu Ala Ile  
 210 215 220  
 agc agt tct tca ttc acg aca agc aac cac agt gtg caa aac aga gat 720

Ser Ser Ser Ser Phe Thr Thr Ser Asn His Ser Val Gln Asn Arg Asp  
 225 230 235 240  
 cat aga gga ggc atg cag ccc tgt tct cct cag aga tgc cag cct cca 768  
 His Arg Gly Gly Met Gln Pro Cys Ser Pro Gln Arg Cys Gln Pro Pro  
 5 245 250 255  
 gcc agc tgc agc cct cac gaa aat ata ctg ccc tat aaa tac aca agc 816  
 Ala Ser Cys Ser Pro His Glu Asn Ile Leu Pro Tyr Lys Tyr Thr Ser  
 260 265 270  
 tgg aga cca cct ttc ccc aaa agg tct gat aga aag gat gtc cag cac 864  
 10 Trp Arg Pro Pro Phe Pro Lys Arg Ser Asp Arg Lys Asp Val Gln His  
 275 280 285  
 aat gaa tgg tac att gga gaa tac agc cgc cag gca gtg gaa gag gca 912  
 Asn Glu Trp Tyr Ile Gly Glu Tyr Ser Arg Gln Ala Val Glu Glu Ala  
 290 295 300  
 15 ttc atg aag gag aac aag gat ggt agt ttc ttg gtc cga gat tgt tcc 960  
 Phe Met Lys Glu Asn Lys Asp Gly Ser Phe Leu Val Arg Asp Cys Ser  
 305 310 315 320  
 aca aaa tcc aag gaa gag ccc tat gtt ttg gct gtg ttt tat gag aac 1008  
 Thr Lys Ser Lys Glu Glu Pro Tyr Val Leu Ala Val Phe Tyr Glu Asn  
 20 325 330 335  
 aaa gtc tac aat gta aaa atc cgc ttc ctg gag agg aat cag cag ttt 1056  
 Lys Val Tyr Asn Val Lys Ile Arg Phe Leu Glu Arg Asn Gln Gln Phe  
 340 345 350  
 gcc ctg ggg aca gga ctc aga gga gat gag aag ttt gat tca gta gaa 1104  
 25 Ala Leu Gly Thr Gly Leu Arg Gly Asp Glu Lys Phe Asp Ser Val Glu  
 355 360 365  
 gac atc atc gaa cac tac aag aat t 1129  
 Asp Ile Ile Glu His Tyr Lys Asn

370 375

<210> 4

5 <211> 376

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Gln Asn Phe Ser Leu Pro Lys Asn Arg Ser Trp Pro Arg Ile Asn

10 1 5 10 15

Ser Ala Thr Gly Gln Tyr Gln Arg Met Asn Lys Pro Leu Leu Asp Trp

20 25 30

Glu Arg Asn Phe Ala Ala Val Leu Asp Gly Ala Lys Gly His Ser Asp

35 40 45

15 Asp Asp Tyr Asp Asp Pro Glu Leu Arg Met Glu Glu Thr Trp Gln Ser

50 55 60

Ile Lys Ile Leu Pro Ala Arg Pro Ile Lys Glu Ser Glu Tyr Ala Asp

65 70 75 80

Thr His Tyr Phe Lys Val Ala Met Asp Thr Pro Leu Pro Leu Asp Thr

20 85 90 95

Arg Thr Ser Ile Ser Ile Gly Gln Pro Thr Trp Asn Thr Gln Thr Arg

100 105 110

Leu Glu Arg Val Asp Lys Pro Ile Ser Arg Asp Val Arg Ser Gln Asn

115 120 125

25 Ile Lys Gly Asp Ala Ser Val Arg Lys Asn Lys Ile Pro Leu Pro Pro

130 135 140

Pro Arg Pro Leu Ile Thr Leu Pro Lys Lys Tyr Gln Pro Leu Pro Pro

145 150 155 160

12/12

Glu Pro Glu Ser Ser Arg Pro Pro Leu Ser Gln Arg His Thr Phe Pro  
165 170 175

Glu Val Gln Gly Met Pro Ser Gln Ile Ser Leu Arg Asp Leu Ser Glu  
180 185 190

5 Val Leu Glu Ala Glu Lys Val Pro His Asn Gln Arg Lys Pro Glu Ser  
195 200 205

Thr His Leu Leu Glu Asn Gln Asn Thr Gln Glu Ile Pro Leu Ala Ile  
210 215 220

Ser Ser Ser Ser Phe Thr Thr Ser Asn His Ser Val Gln Asn Arg Asp  
10 225 230 235 240

His Arg Gly Gly Met Gln Pro Cys Ser Pro Gln Arg Cys Gln Pro Pro  
245 250 255

Ala Ser Cys Ser Pro His Glu Asn Ile Leu Pro Tyr Lys Tyr Thr Ser  
260 265 270

15 Trp Arg Pro Pro Phe Pro Lys Arg Ser Asp Arg Lys Asp Val Gln His  
275 280 285

Asn Glu Trp Tyr Ile Gly Glu Tyr Ser Arg Gln Ala Val Glu Glu Ala  
290 295 300

Phe Met Lys Glu Asn Lys Asp Gly Ser Phe Leu Val Arg Asp Cys Ser

20 305 310 315 320  
Thr Lys Ser Lys Glu Glu Pro Tyr Val Leu Ala Val Phe Tyr Glu Asn

325 330 335  
Lys Val Tyr Asn Val Lys Ile Arg Phe Leu Glu Arg Asn Gln Gln Phe

340 345 350  
25 Ala Leu Gly Thr Gly Leu Arg Gly Asp Glu Lys Phe Asp Ser Val Glu

355 360 365  
Asp Ile Ile Glu His Tyr Lys Asn

370 375

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06351

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 5/10, C07K14/52, 16/24,  
G01N33/53, 33/577, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 5/10, C07K14/52, 16/24,  
G01N33/53, 33/577, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, PIR

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Goitsuka, R. et al., "A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clnk involved in IgE receptor-mediated mast cell degranulation" International Immunology (2000), Vol. 12, No. 4, pp.573-580	1-10
PX	Goitsuka, R., "Mast Saibou ni Hatsigen suru BASH/SLP-76 Family Signal Dentatsu Bunshi", Igaku no Ayumi (2000), Vol.192, No.10, pp.1027-1031	1-10
PX	Ming Yu Cao, et al., "Cluk, a Novel SLP-76-related Adaptor Molecule Expressed in Cytokine-stimulated Hemopoietic Cells" J. Exp. Med. (November, 1999), Vol.190, No.10, pp.1527-1534	1-10
A	Goitsuka, R. et al., "Cutting Edge: BASH, A Novel Signaling Molecule Preferentially Expressed in B Cells of the Bursa of Fabricius" J. Immunol. (1998), Vol.161, pp.5804-5808	1-10
A	Jackman, K. J. et al., "Molecular Cloning of SLP-76, a 76-kDa Tyrosine Phosphoprotein Associated with Grb2 in T Cells" J. Biol. Chem. (1995), Vol.270, No.13, pp.7029-7032	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 November, 2000 (27.11.00)

Date of mailing of the international search report  
05 December, 2000 (05.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 5/10, C07K14/52, 16/24,  
G01N33/53, 33/577, C12P21/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 5/10, C07K14/52, 16/24,  
G01N33/53, 33/577, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, PIR

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Goitsuka, R. et al. "A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clnk involved in IgE receptor-mediated mast cell degranulation" International Immunology (2000) 第12巻 第4号 p. 573-580	1-10
PX	後飯塚僚 "マスト細胞に発現するBASH/SLP-76ファミリーシグナル伝達分子" 医学のあゆみ (2000) 第192巻 第10号 p. 1027-1031	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Ming Yu Cao, et al. "Cluk, a Novel SLP-76-related Adaptor Molecule Expressed in Cytokine-stimulated Hemopoietic Cells" J. Exp. Med. (1999, Nov.) 第190巻 第10号 p.1527-1534	1-10
A	Goitsuka, R. et al. "Cutting Edge: BASH, A Novel Signaling Molecule Preferentially Expressed in B Cells of the Bursa of Fabricius" J. Immunol. (1998) 第161巻 p.5804-5808	1-10
A	Jackman, K. J. et al. "Molecular Cloning of SLP-76, a 76-kDa Tyrosine Phosphoprotein Associated with Grb2 in T Cells" J. Biol. Chem. (1995) 第270巻 第13号 p.7029-7032	1-10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**